and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis // Vet. Rec.-1979. Vol. 105. P. 156-159.
6. M. Bodeus, C. Cambiaso, M. Surleraux, G. Burtonboy A latex agglutination test for the detection of canine parvovirus and corresponding antibodies // J. Virol. Methods. 1988. Vol. 19. P. 1-12.
7. D.P. Drane, R.C. Hamilton, J.C. Cox. Evaluation of a novel diagnostic test for canine parvovirus // Vet. Microbiol. 1994. Vol. 41, N 3. P. 293-302.
8. I.A.P. McCandlish, H. Thompson, E.W. Fisher [et al.]. Canine parvovirus infection // In Pract. 1981. Vol. 3. P. 5-14.
9. M.M. Midbrand, Y.A. Teramoto, J.K. Collins [et al.]. Rapid detection of canine parvovirus in feces using monoclonal antibodies and enzyme-linked immunosorbent assay // Am. J. Vet. Res. 1984. Vol. 45. P. 2281-2284.

УДК 619:578.822.2:636.7

Т.С. Галкина
ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ ВНИИЗЖ), г. Владимир

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ ПАРВОВИРУСА СОБАК

Введение

Парвовирусный энтерит собак (ПВЭ-Соб) – наиболее распространенное и контагиозное заболеваний собак, преимущественно щенков в возрасте от 1,5 месяцев до 1 года, характеризующееся рвотой, геморрагическим гастроэнтеритом, профузным поносом, миокардитом, лейкопенией, дегидратацией и высокой летальностью (до 100%).

Первый представитель этой группы был выделен L. Kilham от крыс в 1959 г. Парвовирус собак впервые выделил и описал Siegl в 1976 г. В 1978 г. явившийся причиной этой инфекции в Америке Appel, Eugester et. al. выделили возбудителя. Распространение болезни носило характер пандемии, и в период с 1978 по 1981 год охватило все континенты мира. Проникновение парвовирусного энтерита собак в нашу страну совпало с Олимпийскими Играми 1980 г. Тогда же было положено начало в изучении методов диагностики и профилактики парвовирусного энтерита собак в России [2, 3, 4].

Источником инфекции служат вирусоносители, а также больные собаки, которые выделяют вирус во внешнюю среду с фекалиями, слюной, рвотными массами в первые 4-7 дней после заболевания. Заражение животных происходит алиментарным и аэрогенным путями. Вирус локализуется в эпителии крипт слизистой оболочки кишечника. Первичное место репликации вируса – тимус. Парвовирусный антиген обнаруживают в языке (96,3%), глотке (81%), пищеводе (50%), в слизистой оболочке кишечника (85,2%), в костном мозге (81,6%), селезенке (79,7%), тимусе (66,7%), мезентериальных лимфоузлах (60,4%), миндалинах (58,5%) и не выявляется в эпителии кожи и слизистых мужских и женских гениталий [4].

В настоящее время, были исследованы на чувствительность к парвовирусу собак различные первичные (фибробласты эмбрионов кур и перепелов, почек котят, собак, крольчат, тестикул быка, селезенки кошки) и перевиваемые культуры клеток (MDBK- почки быка, MV- легкого норки, ПК-91- почки кошки, 2 клеточные линии почек собак А-72 и MDCK). Высокие титры гемагглютининов (1:4096-1:16384) регистрировались в инфицированных перевиваемых культурах клеток ПК-91, (1:128-1:8192) MDCK и первичных культурах клеток почек котят, более низкие (1:128-1:512) - в первичных культурах клеток селезенки кошки и почек собак. Малочувствительными или нечувствительными к заражению были культуры клеток фибробластов эмбрионов кур и перепелов, почек эмбрионов свиней и эмбрионов коров, тестикул быка, почки крольчат, а из перевиваемых - MDBK и MV [1,2,3,5,8]. Ряд авторов [6,7], определили способность различных штаммов парвовируса к репликации в клеточных культурах, полученных из тканей кошек (NLFC - кошачья почечная линия) и собак (А-72, MDCK- собачья почечная линия), они были тестированы на их способность поддерживать репродукцию парвовирусов.

В нашу задачу входило выделение изолятов парвовируса собак из патологического материала от больных животных и

подбор наиболее чувствительных культур клеток для дальнейших научных исследований по изучению биологических свойств возбудителя.

Материалы и методы

В период 2005-2006 гг. от беспородных щенков в возрасте 1,5-3 месяцев, содержащихся в приюте Центра Животных «Валента» г. Владимира, подозреваемых по заболеванию ПВЭСоб были взяты пробы кала, а от павших и вынужденно убитых пробы языка, сердца, печени, селезенки, кишечника, содержимого кишечника. Отобранные пробы исследовали на наличие вируса в ИФА с помощью «Набора для выявления антигенов парвовирусного энтерита собак, вирусного энтерита норок и панлейкопении кошек иммуноферментным анализом» производства НПО «Нарвак», в соответствии с инструкцией по применению, и в РГА с эритроцитами свиньи. Для выделения парвовирусного антигена из патологического материала и наработки вирусного материала использовали: первичнотрипсинизированные культуры клеток ПК (почки котенка), ПЩ (почки щенка), СК (селезенки котенка), ТК (тестикулы козленка) и перевиваемые линии клеток MDCK (почки собаки), CrFK (почки кошки), FS (селезенки кошки), Vero (почки зеленой мартышки), ППК (почки свиньи), ЭН (эмбриона норки).

Результаты исследований

Для исследования из проб кала, языка, сердца, печени, селезенки, кишечника, содержимого кишечника готовили 10%-ную суспензию на фосфатно-буферном растворе с pH 6,6 и центрифугировали ее в течение 15 мин при 1500-2000 об/мин. Надосадочную жидкость исследовали на наличие вируса в ИФА и РГА.

Результаты ИФА учитывали визуально: лунки с исследуемыми образцами, в которых присутствовал специфический антиген, имели характерное окрашивание (сине-голубое). Реакция считалась положительной, когда была заметна разница в интенсивности окрашивания опытных и контрольных лунок планшета.

Положительные в ИФА пробы исследовали в РГА, титры гемагглютининов составляли от 1:128 до 1:32768. Отрицательные в ИФА пробы в РГА не агглютинировали эритроциты (табл.1).

Из данных, представленных в таблице 1 видно, что наибольшая концентрация вируса ПВЭСоб отмечается в ИФА в пробах, приготовленных из языка, кишечника, кала, активность которого в РГА с эритроцитами свиньи составляла 1:128 – 1:32768.

Для выделения вируса на культуре клеток использовали 10%-ную суспензию, приготовленную из проб языка, кишечника и кала, с последующей очисткой хлороформом и микрофильтрации через фильтры «Миллипор» с диаметром пор 22 нм. Следующим этапом работы было внесение парвовирусного антигена с тиром 1:64-1:128 в полностью сформированный монослой первичнотрипсинизированных (ПК, ПЩ, СК, ТК) и перевиваемых культур клеток (MDCK, CrFK, FS, Vero, ППК и ЭН). Чувствительность данных культур к вирусу определяли по уровню накопления в них гемагглютининов в процессе последовательных 3-х и более пассажей (табл. 2).

Из таблицы 2 видно, что более чувствительными культурами клеток к выделенным изолятам парвовируса были кошачьи линии клеток (СК, ПК, CrFK и FS) гемагглютинины в них накапливались в процессе последовательных 3 пассажей в высоких титрах (1:128-1:8192), а в других культурах (ПЩ, ТК, MDCK, Vero, ППК, ЭН) они сни-

Таблица 1

Результаты выделения парвовирусного энтерита из биоматериала от больных и подозреваемых по заболеванию щенков

Биоматериал (10% суспензия):	Активность вируса в:	
	ИФА	РГА
Язык	+	1:128 – 1:1024
Сердце	-	-
Печень	-	-
Селезенка	-	-
Кишечник	+	1:1024 – 1:32768
Содержимое кишечника	-	-
Проба фекалия	+	1:128 – 1:8192

Примечание: «+» – положительная реакция,
«-» – отрицательная реакция.

Таблица 2

Чувствительность первичнотрипсинизированых и перевиваемых культур клеток к парвовирусу собак (по данным РГА)

Культуры клеток	Пассаж 1	Пассаж 2	Пассаж 3	Пассаж 4	Пассаж 5
ПЩ	1:16-1:128	1:32-1:128	1:16-1:32	1:4-1:8	-
ПК	1:64-1:512	1:64-1:512	1:128-1:512	1:64-1:128	-
СК	1:64-1:1024	1:64-1:1024	1:128-1:1024	1:64-1:128	-
ТК	1:16-1:32	1:4-1:8	-	-	-
MDCK	1:32-1:128	1:16-1:64	1:2-1:8	-	-
CrFK	1:128-1:512	1:128-1:1024	1:256-1:4096	1:256-1:2048	1:128-1:1024
FS	1:64-1:1024	1:128-1:4096	1:256-1:8192	1:512-1:8192	1:512-1:4096
Vero	1:8-1:16	1:2-1:4	-	-	-
ППК	1:16-1:32	1:4-1:16	-	-	-
ЭН	1:32-1:128	1:8-1:16	-	-	-

Примечание: «-» - отрицательная реакция.

жались к 3-му пассажу (1:2-1:32) или вообще не наблюдались. Видимого цитопатического действия ни в одной из культур выделенные изоляты не проявляли.

Таким образом, на основании полученных данных, установлено, что наибольшая активность вируса ПВЭСоб в ИФА и РГА отмечается в пробах приготовленных из языка, кишечника и кала. По результатам проведенных нами опытов можно сказать, что для выделения парвовируса собак из патологического материала и наработки вирусного материала можно использовать как первичнотрипсинизированные культуры клеток СК, ПК, так и перевиваемые культуры клеток CrFK и FS. Однако, на наш взгляд, наиболее перспективными культурами для репродукции парвовируса собак являются перевиваемые культуры клеток CrFK и FS, так как применение первичнотрипсинизированных культур клеток не экономично и не удобно из-за: сезонности получения доноров ткани, контаминации культур клеток различными вирусами и бактериями, а также невозможности длительного пассирования вируса in vitro из-за низкой технологичности данных культур.

Заключение

Установлено, что при выделении полевых изолятов парвовируса собак от больных животных из патологического материала наивысшие титры получены в пробах из языка, кишечника и кала. Исследование большого спектра перевиваемых и первичнотрипсинизированых культур клеток показало, что наиболее чувствительными и технологичными являются кошачьи линии перевиваемых культур клеток CrFK и FS.

РЕЗЮМЕ

Представлены данные по выделению возбудителя парвовирусного энтерита от беспородных щенков и изучению чувствительности первичнотрипсинизированных и перевиваемых культур клеток к указанному возбудителю с целью изучения его биологических свойств.

SUMMARY

Data on the isolation of parvovirus enteritis agent from stray dog puppies and study of primarily trypsinized and continuous cell cultures for their sensitivity to the said agent for investigation of its biological properties are presented in the paper.

Литература

1. А.Г. Дурыманов, А.М. Шестопалов. Новая перевиваемая культура клеток почки кошки (ПК-91), перспективная для репродукции парвовирусов плотоядных // Биотехнология. 1999. № 6. С. 42-44.
2. М.М. Рахманина, А.А. Сулимов, А.В. Селиванов. Биологические свойства парвовируса собак // Ветеринария. 1992. № 7-8. С. 21-26.
3. М.М. Рахманина, Биологические свойства парвовируса собак, лабораторная диагностика болезни: автореф. дис. … канд. вет. наук. М., 1993. 25 с.
4. В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В Фомина. Парвовирусная инфекция собак. Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП, 1998. С. 561-570.
5. А.М. Шестопалов, М.И.Кисурина, А.Г. Дурыманов. Сравнительная характеристика некоторых парвовирусов плотоядных // Вопр. вирусологии. 1998. № 5. С. 199-204.
6. L.N. Binn, R.H. Marchwiki, E.H. Stephenson. Establishment of a canine cell line: derivation, characterization and viral spectrum // Am. J. Vet. Res. 1980. Vol. 41, N 6. P. 855-860.
7. F.B. Johnson, M.D. Hoggan. Structural proteins of HADEN- virus // Virology. 1973. Vol. 51, N 1. P. 129–137.
8. U. Truyen, C.R. Parrish. Canine and feline host range of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo // J. Virol. 1992. Vol. 66, N 9. P. 5399-5408.